

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年5月30日 (30.05.2002)

PCT

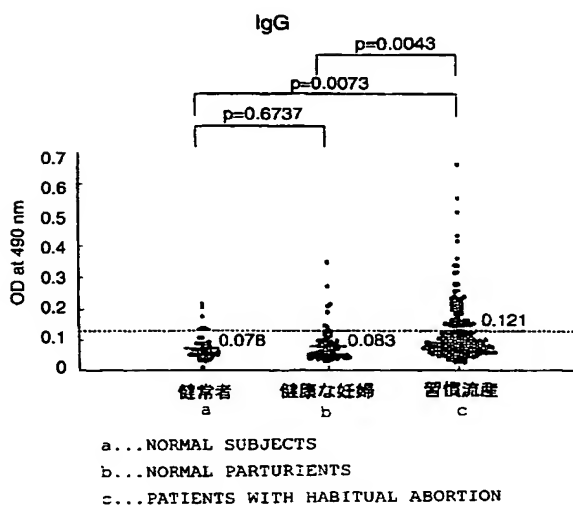
(10) 国際公開番号
WO 02/42769 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/53 (71) 出願人 および
(72) 発明者: 松浦栄次 (MATSUURA, Eiji) [JP/JP]; 〒700-0916 岡山県岡山市西之町7丁目20-801 Okayama (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/10138
- (22) 国際出願日: 2001年11月20日 (20.11.2001) (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 稲垣純子 (INAGAKI, Junko) [JP/JP]; 〒701-1151 岡山県岡山市津高台1丁目2006-14 Okayama (JP). 青木耕治 (AOKI, Koji) [JP/JP]; 〒466-0825 愛知県名古屋市中区八事本町100-32 Aichi (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2000-355148 (74) 代理人: 浅村 皓, 外 (ASAMURA, Kiyoshi et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).
2000年11月22日 (22.11.2000) JP

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF ASSAYING ANTILAMININ-1 ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF

(54) 発明の名称: 抗ラミニン-1抗体の測定法およびその応用



(57) Abstract: An antilaminin-1 antibody in a sample is detected by reacting a serum or plasma sample collected from a human subject with laminin-1 or its fragment and then examining whether or not the antilaminin-1 antibody, which is an autoantibody against laminin-1, in the sample has bound to laminin-1. Thus, gynecological diseases such as habitual abortion, sterility, infertility and endometriosis can be diagnosed.

(57) 要約:

WO 02/42769 A1

ヒトから採取した血清または血漿サンプルをラミニン-1またはそのフラグメントと反応させた後、サンプル中のラミニン-1に対する自己抗体である抗ラミニン-1抗体がラミニン-1に結合したか否かを測定してサンプル中の抗ラミニン-1抗体を検出することにより、習慣流産、不妊症、不育症、子宮内膜症などの婦人科関連疾患を診断することが出来る。

BEST AVAILABLE COPY



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特

許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

抗ラミニン-1抗体の測定法およびその応用

5 技術分野

本発明は、ラミニン-1に対する自己抗体（抗ラミニン-1抗体）の測定法、該方法を実施するためのキット、および習慣流産、不妊症、不育症、子宮内膜症などの婦人科関連疾患の診断などの臨床への応用に関するものである。

10 背景技術

習慣流産とは、妊娠はするものの、自然流産あるいは死産を反復することを意味する。この習慣流産の原因は多岐にわたり、免疫機能の異常もその1つと考えられている。

- 自己免疫的原因による習慣流産を診断する手段としては、自己抗体である抗カルジオリピン抗体（最近、この自己抗体の抗原はカルジオリピンと $\beta 2$ -グリコプロテインI（ $\beta 2$ -GPI）との複合体であることが明らかとされ、 $\beta 2$ -GPI依存性抗カルジオリピン抗体と称されている）を測定する方法などが知られている。

- しかしながら、上記方法の信頼性は完璧ではないので、測定の結果が陰性であっても習慣流産の可能性は否定できなかった。また、他のマーカーを組み合わせ
- て測定したとしても、満足する結果は得られていない。そのため、既存のマーカーとは異なる新たなマーカーの開発が望まれていた。

また、不妊症、不育症、子宮内膜症においても習慣流産と似たような状況であり、より簡便で信頼性の高いマーカーの開発が望まれていた。

- ラミニンは基底膜内に存在する最も豊富な糖タンパク質で、ナイドジェン、I
- V型コラーゲンなどの基底膜のその他の成分と複合体を形成している。また、ラミニンは、通常、3本のポリペプチドがコイル状により合わさって非対称の十字型の構造をとり、多くのアイソフォームの存在が確認されている。すなわち、ラミニンを構成する3つのポリペプチドである α 鎖（ $\sim 400\text{ kDa}$ ）、 β 鎖（ $\sim 200\text{ kDa}$ ）および γ 鎖（ $\sim 200\text{ kDa}$ ）の組み合わせによって様々なアイ

ソフォームを形成することが可能であり、現在まで、少なくとも12個のアイソフォームの存在が報告されている (J. Cell Biol., 137, 685-701(1997)、J. Cell Biol., 145, 605-618(1999))。

たとえば、ラミニン-1 ($\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$) は腎臓、胎児脳、網膜、血管等
5 に存在し、メロシン (=ラミニン-2 ; $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$) は骨格筋、心臓、胎盤等に存在し、s-ラミニン (=ラミニン-3 ; $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$) は神経筋末端プレートの接合部の基底膜、血管内皮および糸球体基底膜に存在し、s-メロシン (=ラミニン-4 ; $\alpha 2$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$) はSchwann細胞、胎盤などに存在し、カリニン/ナイセイン (=ラミニン-5 ; $\alpha 3$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 2$) とk-ラ
10 ミニン (=ラミニン-6 ; $\alpha 3$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$) とks-ラミニン (=ラミニン-7 ; $\alpha 3$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$) は皮膚の基底膜に特有のものであることが明らかとなっている。

このようなラミニンあるいはそのフラグメントを検出することにより、肝線維症/肝硬変、アルコール性肝線維症、糖尿病性合併症、腎疾患、慢性多発関節炎、
15 腫瘍、アルツハイマー症などの様々な疾患の診断に利用できる可能性があることが報告されている。

また、ラミニンに対する自己抗体である抗ラミニン抗体に関しても、抗ラミニン抗体が流産しやすいサルの血清から検出されること、抗ラミニン抗体を含む血清を培養したラットの胎児に添加すると、胎児の異常が起こること、抗ラミニン
20 抗体をマウスに免疫することにより流産を誘導することができること等が報告 (Fertil. Steril., 51, 711-718(1989)、Teratology, 40, 47-57(1989)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6818-6822(1995)、Am. J. Pathol., 110, 346-357(1983)) されていることから、抗ラミニン抗体は流産を引き起こす原因の1つではないかと推測されている。

25 しかしながら、ヒトにおける抗ラミニン抗体の測定の意義は、血清には存在せず、尿中に特異的に存在する分子量200kDaのラミニンに対する自己抗体の測定が全身性エリテマトーデス (SLE) の診断に利用できる可能性が報告 (特開平8-36966、J. Autoimmun., 8(2), 279-291(1995)) されているだけで、習慣流産、不妊症、不育症、子宮内膜症などの婦人科関連疾患の診断に使用でき

るか否かに関してはまったく示唆されていない。

発明の開示

本発明者らは、婦人科関連疾患における新たなマーカーとしてラミニンに注目
5 し、鋭意検討を重ねた結果、種々のラミニンアイソフォームの中のラミニン-1
(分子量：約900kDa)に対する自己抗体である抗ラミニン-1抗体が習慣
流産、不妊症、不育症、子宮内膜症などの婦人科関連疾患の患者血清に特異的に
存在し、この抗ラミニン-1抗体の測定が婦人科関連疾患の診断に有用であるこ
とを見だし、本発明を完成させた。

10 すなわち、本発明は、サンプルをラミニン-1またはそのフラグメントと反応
させた後、サンプル中の抗ラミニン-1抗体がラミニン-1またはそのフラグメ
ントに結合したか否かを測定することからなる、サンプル中の抗ラミニン-1抗
体の測定法に関するものである。

また、本発明は、構成試薬としてラミニン-1またはそのフラグメントを含み、
15 サンプル中の抗ラミニン-1抗体の抗体量を測定する方法に用いられるキットに
関するものである。

さらに本発明は、上記方法またはキットにより測定したサンプル中の抗ラミニ
ン-1抗体の測定値から婦人科関連疾患を検出する方法に関するものである。

20 図面の簡単な説明

図1A及び図1Bは、健常者、健康な妊婦、習慣流産から採取したサンプル中
の抗ラミニン-1抗体(IgG/IgM)の測定結果を示したものである。

図2は、妊娠していない健常者、子宮内膜症を有する不妊症患者および子宮内
膜症を有しない不妊症患者から採取したサンプル中の抗ラミニン-1抗体(Ig
25 G)の測定結果を示したものである。

図3は、子宮内膜症患者の重症度と抗ラミニン-1抗体レベルとの関係を示し
たものである。

図4は、抗ラミニン-1抗体レベルとCA-125値との間の相関を示したも
のである。

図5は、IVF患者における抗ラミニン-1抗体のラミニン-1とラミニン- α 1鎖のGドメインとに対する交差反応性を示したものである。

発明を実施するための最良の形態

- 5 測定対象のサンプルとしては、抗ラミニン-1抗体を含有すると疑われるサンプルであれば特に制限されない。そのようなサンプルを具体的に例示すれば、ヒトの血液、血清、血漿などをあげることができ、特に血清及び血漿サンプルが好適である。

- サンプル中の抗ラミニン-1抗体の測定は、サンプルをラミニン-1と反応させた後、サンプル中の抗ラミニン-1抗体がラミニン-1に結合したか否かを測定することにより実施できる。

使用するラミニン-1としては、公知の方法（J. Biol. Chem., 254, 9933-9937(1979)）に従い癌細胞より調製したもの、あるいは市販のラミニン-1（旭テクノグラス社製）を使用することができる。

- 15 また、サンプル中の抗ラミニン-1抗体との反応性を失わない限りにおいて、ラミニン-1の酵素あるいは化学処理により得られるフラグメントあるいはそれをコードする遺伝子を用いたDNA組換え技術により製造した組換えフラグメント等であってもかまわない。このようなフラグメントとしては、例えばラミニン- α 1鎖のGドメイン（アミノ酸残基2111-3060；J. Biol. Chem., 20 275(38) 29458-29465 (2000)）などが挙げられる。

ラミニン-1またはそのフラグメントの使用形態としては、固相化物もしくは標識化物の形態で使用する事ができる。

- ラミニン-1またはそのフラグメントの固相化に使用できる担体の材質としては、ラミニン-1またはそのフラグメントとの結合性の高いものであれば特に制限されず、例えば、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、スチレン-無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレンなどの合成有機高分子化合物、デキストラン誘導体（セファデックスなど）、アガロースゲル（セファロース、バイオゲルなど）、セルロース（ペーパーディスク、濾紙な

ど)などの多糖類、ガラス、シリカゲル、シリコーンなどの無機高分子化合物が挙げられ、これらはアミノ基、アミノアルキル基、カルボキシ基、アシル基、水酸基などの官能基を導入したものであってもかまわない。

担体の形状としては、マイクロタイタープレート、ディスクなどの平板状、ビーズなどの粒子状、試験管、チューブなどの管状、その他繊維状、膜状などが例示され、測定法に応じて適宜選択することができる。

固相担体へのラミニン-1またはそのフラグメントの固相化は、物理的吸着法、イオン結合法、共有結合法、包括法など公知の方法を用いて行えばよい。

このようにして得られた固相試薬は、非特異的結合を抑制するために、BSA、糖、スキムミルクなどの通常のプロッキング剤を用いてプロッキング処理を施してもかまわない。

また、標識化ラミニン-1またはそのフラグメントを調製する場合、使用する標識体としては、放射性同位体 (^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I など)、酵素 (β -ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど)、補酵素・補欠分子族 (FAD、FMN、ATP、ビオチン、ヘムなど)、蛍光色素 (フルオレセイン誘導体、ローダミン誘導体など)、金属粒子 (金、銀、白金など) などを使用することができる。

ラミニン-1またはそのフラグメントの標識化は、選択した標識剤に適した公知の方法 (例えば「続生化学実験講座5免疫生化学研究法」(株)東京化学同人、(1986年発行)第102~112頁参照) に従って行えばよい。

このような固相化物及び/または標識化物を用いたサンプル中の抗ラミニン-1抗体の測定は、サンプル中の自己抗体などの抗体の測定法として汎用されている方法に準じて行えばよく、たとえば、固相化ラミニン-1またはそのフラグメントを用いたサンプル中の抗ラミニン-1抗体の具体的な測定手順は以下の通りである。

固相化ラミニン-1を用いた方法

(a) 抗ラミニン-1抗体を含有する疑いのあるサンプルを、ラミニン-1またはそのフラグメントが固定化されてなる固相担体とインキュベートし、

(b) 該固相担体を洗浄して、過剰のサンプルを除去し、

(c) 該固相担体を標識化された抗ヒトイムノグロブリン抗体とインキュベートし、そして

(d) 固相と液相を分離 (B F 分離) 後、どちらかの相の標識量を測定して、サンプル中の抗ラミニン-1 抗体の抗体量を算出する。

- 5 また、標識化ラミニン-1 またはそのフラグメントを用いたサンプル中の抗ラミニン-1 抗体の具体的な測定手順は、たとえば以下の通りである。

標識化ラミニン-1 を用いた方法

(a) 抗ラミニン-1 抗体を含有する疑いのあるサンプルを、標識されたラミニン-1 またはそのフラグメントとインキュベートし、

- 10 (b) 抗ラミニン-1 抗体と結合した標識化ラミニン-1 またはそのフラグメントと未結合の標識化ラミニン-1 またはそのフラグメントとを分離し、そして
(c) どちらか一方の相の標識量を測定して、サンプル中の抗ラミニン-1 抗体の抗体量を算出する。

- また、抗ラミニン-1 抗体を測定するためのキットは、キットの構成試薬としてラミニン-1 またはそのフラグメントを含有していればよく、その他の構成試薬は、キットの採用する測定法に応じて適宜必要とされる試薬を添付すればよい。たとえば、固相化ラミニン-1 またはそのフラグメントを用いた抗ラミニン-1 抗体測定用キットとしては、次のようなものを例示することができる。

- ① 固相化ラミニン-1 またはそのフラグメント
20 ② 標識化抗ヒトイムノグロブリン抗体

また、標識化ラミニン-1 またはそのフラグメントを用いた抗ラミニン-1 抗体測定用キットとしては、次のようなものを例示することができる。

- ① 標識化ラミニン-1 またはそのフラグメント
② B F 分離剤 [D C C (デキストラン被覆活性炭)、ポリエチレングリコール、
25 硫酸アンモニウムなど]

さらに上記キットには、採用する測定法あるいは標識の種類などにより必要な試薬 (サンプル希釈溶液、洗浄溶液、酵素基質溶液、反応停止液、標準抗体溶液など) を適宜添付することができる。

このようなキットを用い、上述した方法によりサンプル中の抗ラミニン-1 抗

体を測定し、健常人の測定値と比較し、その結果が健常人レベルよりも高い場合には習慣流産、不妊症、不育症、子宮内膜症などの婦人科関連疾患の可能性大と判断し、精密検査を行うのが好ましい。

5 実施例

以下、本発明を実施例をあげて具体的に説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

実施例 1

(1) サンプル

- 10 流産経験のある女性（習慣流産）207人（平均年齢：31.0±3.8歳、平均流産回数：2.7±1.1回）、健康な妊婦100人（平均年齢：30.7±4.5歳）及び妊娠していない健常者40人（女性）（平均年齢：29.6±5.1歳）から血液を採取し、サンプルとした。ただし、流産経験のある207人のうち、アレルギー疾患のある30人のサンプルは測定から除外した。

15 (2) アッセイ

①β2-GPI依存性抗カルジオリピン抗体の測定

- β2-GPI依存性抗カルジオリピン抗体のELISAは松浦らの方法（J. Immunol. 148, 3885-3891(1992)）を多少変更して行った。すなわち、ポリスチレン製マイクロタイタープレート（Immulon-1:Dynex Technologies Inc.）にカルジオリピン（2.5μg/50μl/ウエル）をコートし、1%BSAでブロッキング後、ヒトβ2-GPI（1.0μg/50μl）と100倍希釈血清サンプル（50μl）を各ウエルに添加し、よく攪拌後、室温で30分間インキュベートする。

- 25 インキュベーション後、過酸化水素含有テトラメチルベンチジン溶液を添加して反応させた後、2N硫酸を添加して反応を停止させ、450nmの吸光度を測定し、標準曲線から抗カルジオリピン抗体の抗体価（units/ml）を算出する。

②ループス・アンチコアギュラントの測定（lupus anticoagulants: LA）

トロンボプラスチンを部分的に活性化するための時間（aPPT）を決定するためのリン脂質として脳ケファリンを使用し、非妊娠のコントロール血漿（50

μ l)、標準血漿 (50 μ l) 及び希釈した脳ケファリン (100 μ l) を混合し、37℃で3分間正確にインキュベートし、25 mM CaCl_2 を100 μ l 添加し、凝血時間を測定する。

標準血漿とサンプル血漿を1:1で混合した時、延長された凝血時間 (平均+5.3 SD、7.37秒より長い) が元に戻らない場合、LAは陽性と判断する。

③抗核抗体 (antinuclear antibody: ANA) と抗DNA抗体の測定

公知の方法 (Am. J. Med., 89, 129-133(1990)) に従い、ANAはHe p G 2細胞スライドを用いた間接免疫蛍光法により測定し、抗DNA抗体は市販のキットを用いて行った。

10 ④抗ラミニン-1抗体の測定

ラミニン-1は、公知の方法 (J. Biol. Chem., 254, 9933-9937(1979)) に従い調製した。

マイクロタイタープレート (Immulon-1B: Dynex Technologies Inc.) にラミニン-1 (10 μ g/ml) をコートし (50 μ l/ウェル)、4℃で一夜インキュベート後、10%牛胎児血清でブロッキング後、200倍希釈血清サンプル (100 μ l/ウェル) を添加し、室温で1時間インキュベートする。

インキュベーション後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) で標識された抗ヒトイムノグロブリン (IgG/IgM) 抗体を添加し、室温で1時間インキュベートし、過酸化水素含有o-フェニレンジアミン溶液を添加して反応させた後、2N硫酸を添加して反応を停止させ、490 nmの吸光度を測定する。測定値が妊娠していない健常者の血漿中の抗ラミニン-1抗体の平均+SDよりも大きい場合には、抗ラミニン-1抗体は陽性と判断する。

(3) 結果

前記サンプルを測定した結果、習慣流産の女性から採取したサンプル中の抗ラミニン-1抗体 (IgG) のレベルは、健康な妊婦及び妊娠していない健常者の抗ラミニン-1抗体 (IgG) レベルと比較して有意に高値を示した ($P=0.0043$ 、 $P=0.0073$) (図1参照)。

また、抗ラミニン-1抗体 (IgG) は、習慣流産の177サンプル中、55サンプルが陽性であり (31.1%)、122サンプルが陰性であった (68.

9%)。また、抗ラミニン-1抗体 (I g M) は、49サンプルで陽性で (27.7%)、128サンプルで陰性であった (72.3%)。

正常出産の確率を解析した結果、表1に示すように、抗ラミニン-1抗体 (I g G) 陽性の習慣流産における正常出産の確率は、抗ラミニン-1抗体 (I g G) 陰性の習慣流産における正常出産の確率と比較して有意に低いことが明らかとなった。

また、抗ラミニン-1抗体が陽性の習慣流産と陰性の習慣流産との間には、妊婦の年齢、流産の回数などの有意な差はなかった。

10 表1：抗ラミニン-1抗体と流産回数及び妊娠経過との関係

	抗ラミニン-1抗体 (IgG)		Fisher's exact test (p 値)
	陽性 (n = 38)	陰性 (n = 85)	
年 齢	30.0 ± 3.9	30.0 ± 3.3	有意差なし
過去の流産回数	2.8 ± 1.5	2.8 ± 1.3	有意差なし
妊娠経過 正常出産 確率 (%)	19 50.0	59 69.4	0.032

習慣流産における抗ラミニン-1抗体と他の自己抗体との相関に関して解析した結果、表2に示すように、抗ラミニン-1抗体と他の自己抗体との間に有意な相関は見いだせなかった。また、抗ラミニン-1抗体 (I g G) 陽性の習慣流産
 15 55サンプルにおける自己抗体の出現率は、 β 2-G P I 依存性抗カルジオリピン抗体 (a C L) が1.8% (1/55)、LAが20.0% (11/55)、抗DNA抗体14.5% (8/55) および抗核抗体 (A N A) 21.8% (12/55) であった。

表 2 : 習慣流産における抗ラミニン-1 抗体と他の自己抗体との相関

	抗ラミニン-1 抗体 (IgG)	
	陽性	陰性
a C L %	3 1 . 1	6 8 . 9
陽性	1	3
陰性	5 4	1 1 9
Fisher's exact test P 値	有意差なし	
L A %	3 1 . 1	6 8 . 9
陽性	1 1	1 6
陰性	4 4	1 0 6
P 値	有意差なし	
抗 DNA 抗体 %	3 1 . 1	6 8 . 9
陽性	8	1 8
陰性	4 7	1 0
P 値	有意差なし	
A N A %	3 1 . 1	6 8 . 9
陽性	1 2	1 7
陰性	4 3	1 0 5
P 値	有意差なし	

実施例 2

実施例 1 記載の方法で、不妊症と抗ラミニン-1 抗体との関連性を検討したところ、抗ラミニン-1 抗体 (I g G) は、体外受精を行った不妊症患者 5 0 サンプル中、1 2 サンプルが陽性であり (2 4 . 0 %)、3 8 サンプルが陰性であり (7 6 . 0 %)、健常人の数値と比較して有意に高い出現率を示した (P = 0 . 0 0 8 8)。

また、子宮内膜症を合併した不妊症患者 (体外受精) における抗ラミニン-1 抗体 (I g G) の陽性率は、表 3 に示すように、7 5 % (8 人中 6 名が陽性) と極めて高い値を示した。

表 3 : 子宮内膜症を合併した不妊症患者における抗ラミニン-1 抗体の陽性率

	子宮内膜症			
	%	陽性	陰性	Fisher's exact test (p 値)
抗ラミニン-1 抗体 (IgG)				
陽性	7 5 . 0	6	6	0 . 0 0 1 2 7
陰性	2 5 . 0	2	3 6	

実施例 3

(1) サンプル

腹腔鏡検査または開腹検査を受けた不妊症患者 53 人（平均年齢：33.4 ± 4.7 歳、年齢範囲：26 ~ 45 歳）、人工受精と胚転移を受けた不妊症患者 5 (IVF) 50 人（平均年齢：34.1 ± 4.4 歳、年齢範囲：23 ~ 45 歳、人工授精を受けた平均回数：2.8 ± 2.6 回）及び妊娠していない健常者（女性）39 人（平均年齢：29.6 ± 5.1 歳、年齢範囲：22 ~ 41 歳）から血漿を採取し、サンプルとした。IVF 患者については膣から卵母細胞を摘出する前日に血漿サンプルを採取した。これらの不妊症患者の臨床プロフィール（不妊原因）を表 4 に示した。ただし、不妊症患者の中にはその原因が不明である子宮異常あるいはホルモン異常の患者も含まれていた。IVF 患者 50 人のうち 8 人は子宮内膜症であった。腹腔鏡検査または開腹検査を受けた不妊症患者 53 人は、腹腔鏡検査または開腹検査により子宮内膜症患者とそうでない患者に分けられた。子宮内膜症患者の重症度を American Fertility Society (AFS) による分類法 15 の変法により分類した。即ち、子宮内膜症患者 34 人のうち、7 人がステージ I（最小程度の症状）、6 人がステージ II（軽症）、13 人がステージ III（中程度の症状）、8 人がステージ IV（重症）であった。

(2) アッセイ

①抗ラミニン-1 抗体の測定

20 実施例 1 の (2) ④で記載した方法とほぼ同様の方法により、血漿サンプル中の抗ラミニン-1 抗体を測定した。測定値が妊娠していない健常者の血漿中の抗ラミニン-1 抗体の平均 + SD よりも大きい場合には、抗ラミニン-1 抗体は陽性と判断した。

②腫瘍抗原 125 (CA-125) の測定

25 市販品のラジオイムノアッセイキット (CA-125 II IRMA kit; Centcore, Inc., Malvern, PA) (Cancer Research 1984; 44: 1048-53) を用いてサンプル中の CA-125 を測定した。結果は標準曲線から得た。20 U/ml 値をカットオフ値とした。なお、CA-125 は子宮内膜症のマーカーとしても利用されている。

③ラミニン-α1 鎖の G ドメインを用いた抗ラミニン-1 抗体の測定

ラミニン- α 1鎖のGドメイン（アミノ酸残基#2111-3060）をコードするプラスミドで形質転換されたチャイニーズ・ハムスター卵母細胞の培養液から、ハイトラップヘパリンアフィニティーカラムとFPLCシステムを用いてラミニン- α 1鎖の組換えGドメインを精製した（J. Biol. Chem., 2000; 275: 29458-65）。組換えGドメインをポリスチレンプレート（Immulon 1B）にコートし（ $1\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ /ウェル）、 4°C で一夜インキュベート後、ブロッキングした。25倍希釈サンプル（ $100\mu\text{l}$ /ウェル）をウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした。次いで実施例1の（2）④で記載した方法と同様の方法により、ラミニン- α 1鎖の組換えGドメインに結合した抗ラミニン-1抗体を測定した。

（3）結果

①抗ラミニン-1抗体と不妊症の原因との関係

50人のIVF患者を含む103人の不妊症患者と妊娠していない健常者39人からのサンプルについて抗ラミニン-1抗体を測定し、不妊症の原因と抗ラミニン-1抗体レベルとの関係を分析した。得られた結果を表4に示した。表4から分かるように、抗ラミニン-1抗体陽性の患者と子宮内膜症との間には有意な相関関係があった。抗ラミニン-1抗体陽性患者32人のうち21人（66%）が子宮内膜症であり、抗ラミニン-1抗体陰性患者71人のうち21人（30%）（ $p=0.00063$ ）が子宮内膜症であった。不妊症の他の原因と抗ラミニン-1抗体陽性患者との間には有意な相関関係は見られなかった。

表4：抗ラミニン-1抗体と臨床プロファイル

臨床プロファイル		抗ラミニン-1抗体 (IgG)		
		陽性 (n=32)	陰性 (n=71)	Fisher's exact test (p値)
平均年齢(±SD)	33.8±4.6	33.5±4.5	33.9±4.6	有意差なし
不妊症診断 (不妊原因)				
卵管	24/103 (23%)	6/32 (19%)	18/71 (25%)	有意差なし
男性	24/103 (23%)	4/32 (13%)	20/71 (28%)	有意差なし
子宮内膜症	42/103 (41%)	21/32 (66%)	21/71 (30%)	0.00063
卵管と男性	2/103 (1.9%)	0/32 (0%)	2/71 (30%)	有意差なし
卵管と子宮内膜症	12/103 (12%)	5/32 (16%)	7/71 (10%)	有意差なし
男性と子宮内膜症	4/103 (3.9%)	2/32 (6.3%)	2/71 (2.8%)	有意差なし
不明	35/103 (34%)	9/32 (28%)	26/71 (37%)	有意差なし

図2に、妊娠していない健常者、子宮内膜症の不妊症患者および子宮内膜症でない不妊症患者から採取したサンプル中の抗ラミニン-1抗体 (IgG) の測定結果を示した。図2から分かるように、不妊症患者 (n=103) の抗ラミニン-1抗体レベルは、妊娠していない健常者 (n=39) のそれより有意に高値を示した (p=0.0029)。不妊症患者103人のうち32人 (31%) が抗ラミニン-1抗体陽性であった。子宮内膜症の不妊症患者の抗ラミニン-1抗体レベルは、妊娠していない健常者及び子宮内膜症でない不妊症患者のそれよりも有意に高値を示した (p<0.0001)。

腹腔鏡検査または開腹検査を受けた不妊症患者53人については、子宮内膜症患者の重症度と抗ラミニン-1抗体レベルとの関係を調べた。その結果を図3に示した。図3から分かるように、ステージIIまたはステージIIIの子宮内膜症の不妊症患者の抗ラミニン-1抗体レベルは、ステージIあるいはIVの患者のそれに比べてかなり高い値を示した。ステージIIまたはステージIIIの患者のレベルは、子宮内膜症でない不妊症患者のそれよりも有意に高値を示した (それぞれ p=0.0074 と p=0.0025)。ステージIおよびIVの患者のレベルは、子宮内膜症でない患者のそれとは有意には相違しなかった。ステージIIの不妊症患者6人のうち4人 (67%) 及びステージIIIの不妊症患者

者13人のうち7人(54%)が抗ラミニン-1抗体陽性であった。

② I V F 患者における子宮内膜症と抗ラミニン-1抗体およびCA-125との関係

I V F 患者における子宮内膜症と抗ラミニン-1抗体およびCA-125との関係を表5に示した。表5から分かるように、I V F 患者における抗ラミニン-1抗体陽性の頻度は、子宮内膜症を有する患者の方が子宮内膜症でない患者に比べて有意に高かった(子宮内膜症でない患者42人のうち6人(14%)が陽性であるのに対して、子宮内膜症を有する患者8人のうち6人(75%)が陽性であった($p=0.003$)。子宮内膜症を有する患者とCA-125の存在とは有意な関係は見られなかった(子宮内膜症でない患者42人のうち11人(26%)がCA-125陽性であるのに対して、子宮内膜症を有する患者8人のうち4人(50%)がCA-125陽性であった。 $p=0.18$)。

表5：I V F 患者における子宮内膜症と抗ラミニン-1抗体およびCA-125との関係

血清学的パラメータ	子宮内膜症		Fisher's exact test (p値)
	陽性	陰性	
抗ラミニン-1抗体 (IgG)			
陽性	6	6	0.0013
陰性	2	36	
CA-125			
陽性	4	11	有意差なし (0.18)
陰性	4	31	

I V F 患者における抗ラミニン-1抗体とCA-125との関係を表6に示した。表6から分かるように、I V F 患者における抗ラミニン-1抗体陽性とCA-125陽性とは有意な相関関係が見られた($p=0.020$)。しかし、図4に示すように、抗ラミニン-1抗体レベルとCA-125値との間には相関関係が見られなかった($r^2=0.025$)。

表 6 : I V F 患者における抗ラミニン-1 抗体と C A - 1 2 5 との関係

C A - 1 2 5	抗ラミニン-1 抗体 (IgG)		Fisher's exact test (p値)
	陽性	陰性	
陽性	7	8	0. 0 2 0
陰性	5	3 0	

③IVF患者における抗ラミニン-1 抗体のラミニン-1 とラミニン- α 1 鎖の G ドメインとに対する交差反応性

- 5 I V F 患者 5 0 人から採取したサンプルを用いて、抗ラミニン-1 抗体がラミニン- α 1 鎖の G ドメインを認識できるかどうかを調べた。得られた結果を図 5 に示した。図 5 から分かるように、I V F 患者からのサンプル中の抗ラミニン-1 抗体は G ドメインと交差反応した。更に、抗ラミニン-1 抗体とインタクトラミニン-1 分子との免疫反応性と、抗ラミニン-1 抗体と G ドメインとの免疫反
- 10 応性の間には相関関係が認められた。

産業上の利用可能性

- 種々のラミニンアイソフォームの中のラミニン-1 に対する自己抗体（抗ラミニン-1 抗体）が習慣流産、不妊症、不育症、子宮内膜症などの婦人科関連疾患
- 15 の患者血清または血漿に特異的に存在し、この自己抗体は自己免疫疾患で見い出される他の自己抗体（たとえば、抗リン脂質抗体、抗 D N A 抗体、抗核抗体など）との相関もないことから、ヒトの婦人科関連疾患の新規のマーカーとして臨床上有用であることは、本発明者らによって初めて見いだされたことである。

請 求 の 範 囲

1. サンプルをラミニン-1またはそのフラグメントと反応させた後、サンプル中の抗ラミニン-1抗体がラミニン-1またはそのフラグメントに結合したか否かを測定することからなる、サンプル中の抗ラミニン-1抗体の測定法。
2. ラミニン-1またはそのフラグメントが固相に固定化された固相化ラミニン-1またはそのフラグメントである、請求項1記載の方法。
3. ラミニン-1またはそのフラグメントが標識化された標識化ラミニン-1またはそのフラグメントである、請求項1記載の方法。
- 10 4. サンプルが血液、血漿または血清である、請求項1記載の方法。
5. 請求項1記載の方法により測定したサンプル中の抗ラミニン-1抗体の測定値から婦人科関連疾患を検出する方法。
6. 婦人科関連疾患が、習慣流産、不妊症、不育症または子宮内膜症である、請求項5記載の方法。
- 15 7. 構成試薬としてラミニン-1またはそのフラグメントを含み、サンプル中の抗ラミニン-1抗体の抗体量を測定する方法に用いられるキット。
8. ラミニン-1またはそのフラグメントが固相に固定化された固相化ラミニン-1またはそのフラグメントである、請求項7記載のキット。
9. ラミニン-1またはそのフラグメントが標識化された標識化ラミニン-1またはそのフラグメントである、請求項7記載のキット。
- 20 10. 請求項7記載のキットにより測定したサンプル中の抗ラミニン-1抗体の測定値から婦人科関連疾患を検出する方法。
11. 婦人科関連疾患が、習慣流産、不妊症、不育症または子宮内膜症である、請求項10記載の方法。

1 / 3

FIG. 1A

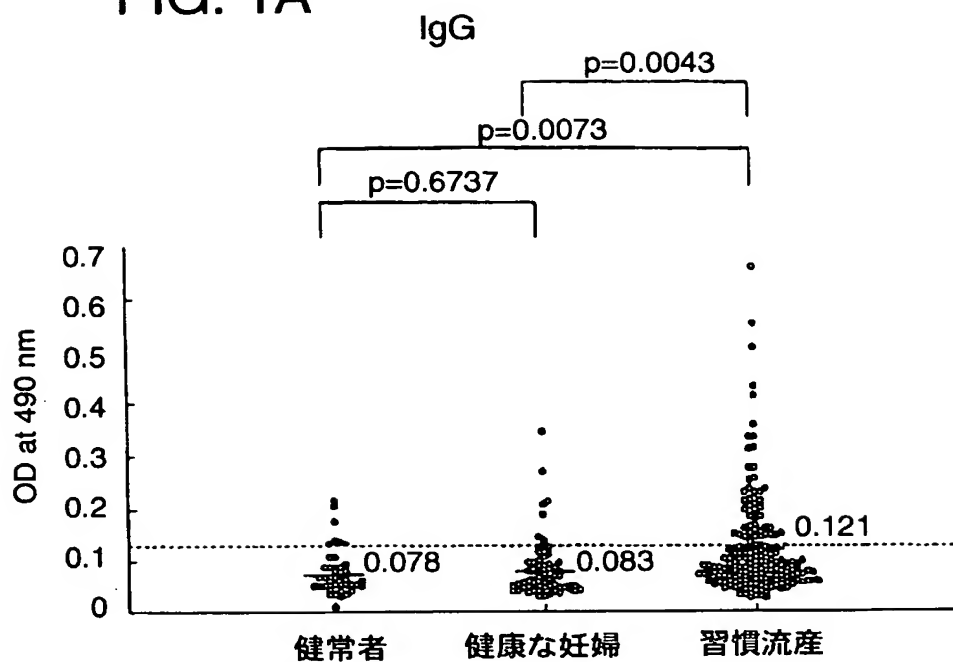
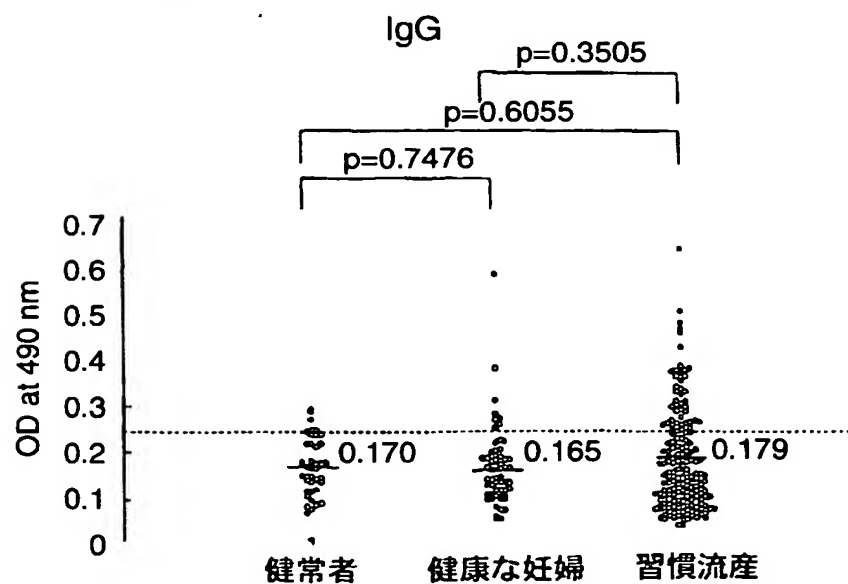


FIG. 1B



2 / 3

FIG. 2

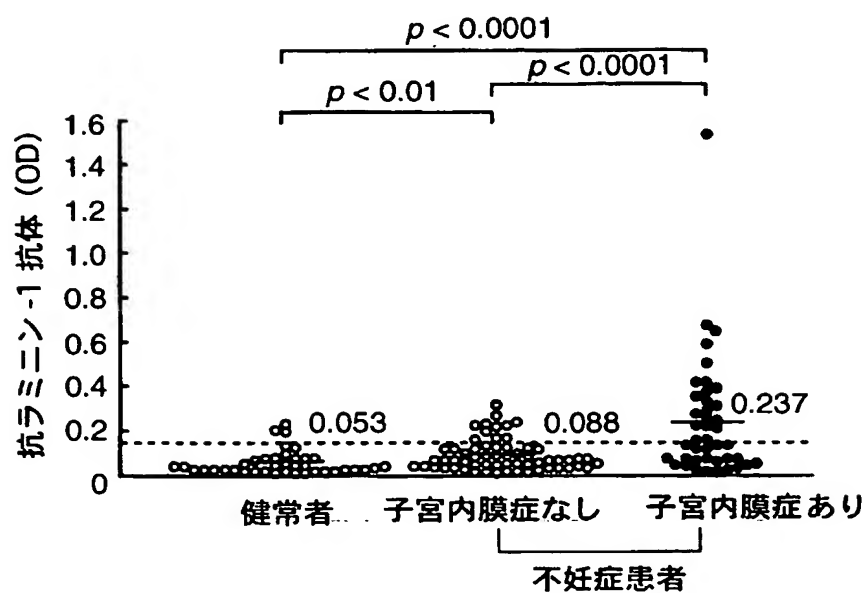
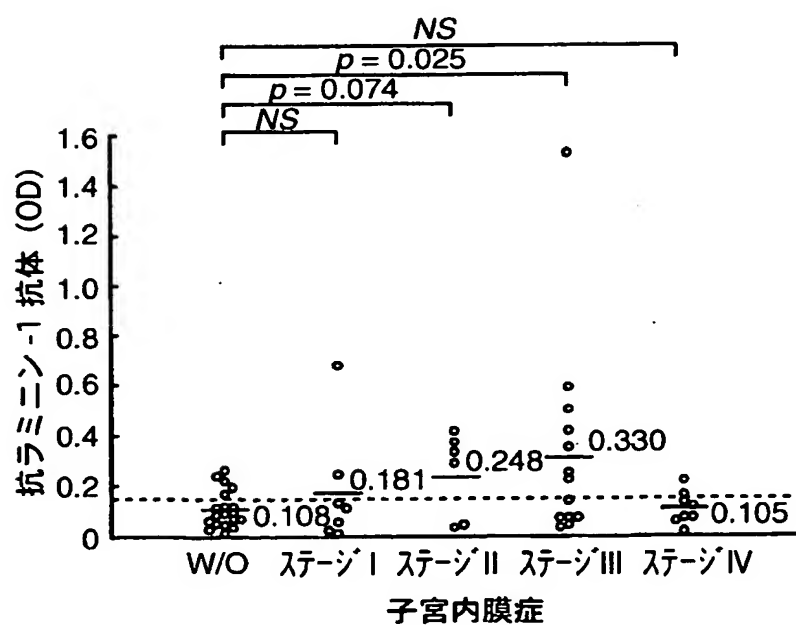


FIG. 3



3/3

FIG. 4

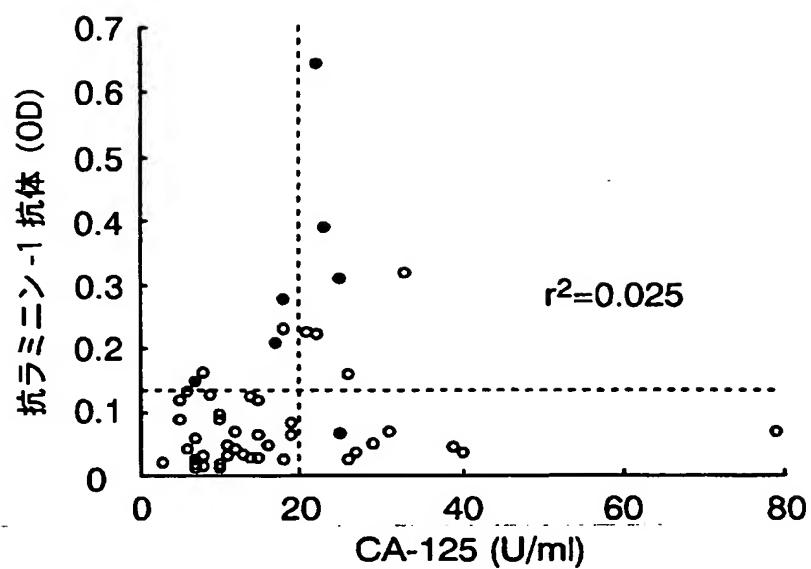
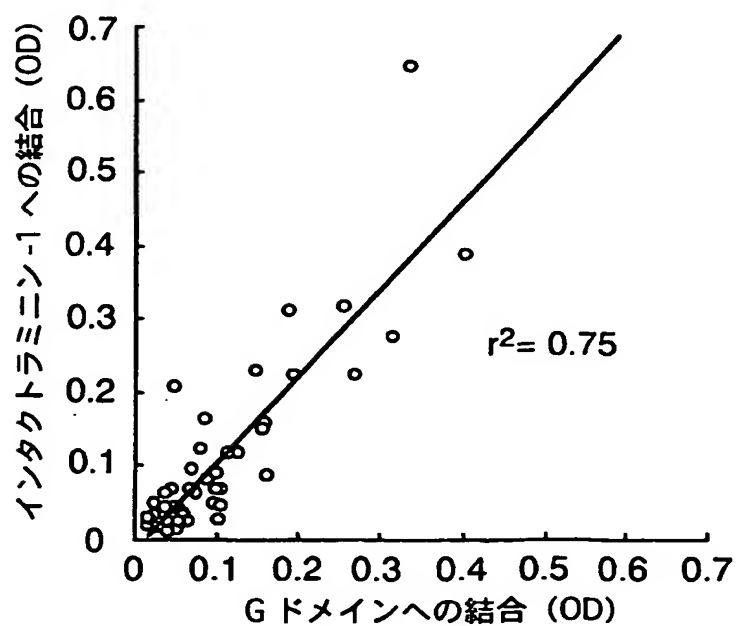


FIG. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10138

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl.⁷ G01N33/53Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2002 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 8-35966 A (Hadasit Medical Research Services & Development Co., Ltd.), 06 February, 1996 (06.02.1996), & EP 670495 A & IL 108811 A & US 5789260 A	1-11
A	JP 4-134097 A (Takara Shuzo Co., Ltd.), 07 May, 1992 (07.05.1992), (Family: none)	1-11
A	JP 2-57194 A (Max-Planck-Gesellschaft zur Foerderung der Wissenschaften E.V.), 26 February, 1990 (26.02.1990), & DE 2923583 A & EP 21152 A & US 4340581 A & AT 6312 E	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 February, 2002 (12.02.02)Date of mailing of the international search report
26 February, 2002 (26.02.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2002年
日本国登録実用新案公報	1994-2002年
日本国実用新案登録公報	1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 8-35966 A (ハダシット メディカル リサーチ サーヴィセズアンド デヴェロップメント カンパニー リミテッ ド) 1996.02.06 & EP 670495 A & IL 108811 A & US 5789260 A	1-11
A	JP 4-134097 A (寶酒造株式会社) 1992.05. 07 ファミリーなし.	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.02.02

国際調査報告の発送日

26.02.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中 靖典

2J

9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	JP 2-57194 A (マックス・プランク・ゲゼルシャフト ・ツール・フェルデルング・デル・ヴィッセンシャフテン・エー・ ファウ) 1990. 02. 26 & DE 2923583 A & EP 21152 A & US 4340581 A & AT 6312 E	1-11

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.